الفصل السادس

نمو الأحياء الدقيقة
Microbial Growth

يُعرَّف النمو على أنه الزيادة في المحتويات الخلوية ، وإذا كانت الأحياء الدقيقة مدمجة خلوياً coenocytic ، أي الكائنات عديدة الأنوية من دون جدر عرضية تفصل الأنوية نتيجة لعدم مصاحبة الانقسام النووي بانقاسم خلوي ، فإن النمو ينتج عن الزيادة في حجم الخلايا وليس في عدد الخلايا. ويؤدي النمو إلى زيادة في أعداد الخلايا عندما تتكاثر الأحياء الدقيقة بعملية مثل التبرعم budding أو الانقسام الثنائي البسيط binary fission. وفي الانقسام الثنائي البسيط تتضخم خلايا الكائن وتنقسم لتعطي خليتين بنويتين متساويتين في الحجم تقريباً. وبطبيعة الحال فإنه ليس من السهولة فحص النمو والتكاثر للكائن الحي الدقيق المفرد بسبب صغر الحجم ، لهذا يفضل دراسة النمو بتتبع التغيرات في العدد الكلي للتعداد (العشيرة population).

كما يمكن أيضاً تعريف النمو على أنه الزيادة في المادة الحية سواء في عدد الخلايا أو الكتلة الكلية للخلايا. وتقيس معدلات النمو growth rates التغير في عدد الخلايا أو كتلة الخلايا بالنسبة لوحدة الزمن. وفي الأحياء الدقيقة وحيدة الخلية يتضمن النمو الزيادة في أعداد الخلايا. وتتكاثر البكتيريا بالانقسام الثنائي البسيط فتتضاعف أعدادها في كل انقسام. ويطلق على الوقت اللازم لتضاعف عدد خلايا أي كائن مصطلح زمن الجيل generation time.

وفي بعض الأحياء الدقيقة الخلوية حقيقية النواة يمكن حصر الزيادة في النمو عن طريق عد الخلايا أو كتلة النمو أو كتلة أي مكون من مكونات النمو الكيميائية مثل ح ن د (د.ن.أ DNA) أو ح ن ر (ر.ن.أ RNA) أو البروتين. هذا ويمكن قياس نمو كل أنواع الأحياء الدقيقة من الفيروسات والبكتيريا والفطريات والطحالب والأوليات وغيرها وذلك بواحدة أو أكثر من الطرق التالية :

١- العدد الكلي لوحدات الكائن الحي.

٢- العدد الحيوي لوحدات الكائن الحي.

٣- الكتلة الجافة أو الرطبة.

٤- كمية ح ن د (د.ن.أ DNA) أو ح ن ر (ر.ن.أ RNA) أو البروتين أو الإنزيم.

ولكننا في هذا الفصل سوف نركز على البكتيريا على اعتبار سهولة وسرعة زراعتها واختباراتها.

طرق تقدير النمو البكتيري
Methods of Determining Bacterial Growth

أثناء نمو عشيرة من الخلايا في مزرعة القطفة الواحدة batch culture مثل معلق البكتيريا في دورق زجاجي، فقد لا توجد، بالضرورة علاقة ثابتة أو فريدة بين زيادة كتلة البكتيريا وعدد خلاياها.

وعقب حقن وسط غذائي بالبكتيريا، فإن بعض خلايا البكتيريا قد تنقسم بمعدل أكثر سرعة عن زيادتها في الكتلة وفي هذه الحالة تصبح الخلايا أصغر، وفي طور متأخر لاحقاً، فإن معدل الزيادة في كتلة الخلايا قد يفوق الزيادة في أعداد الخلايا، لهذا تصبح الخلايا أكبر. بناء عليه، فمن الضروري التمييز بين الزيادة في كتلة الخلايا والزيادة في أعدادها. ومن ناحية أخرى، فعندما تتقابل مع أطوار النمو حيثما تتساوى الزيادة في كتلة الخلايا وفي أعدادها عندئذ فلا يجب أن نتعامل مع هذين المعيارين منفصلين. وتحت هذه الظروف من النمو المتوازن يمكن تطبيق معيار قياس مناظراً للكتلة الخلوية الكلية بواسطة الكثافة الضوئية Optical Density (O.D) بدلاً من قياس أعداد الخلايا. وفي هذه الحالة توجد علاقة طردية بين أعداد الخلايا وبين الكثافة الضوئية. ويلاحظ أنه يمكن إرجاع (نسب) كتلة الخلايا في وحدة الحجم (١ مل أو لتر) لتركيز الخلايا أو كثافتها (جرام أو ملليجرام).

تقدير أعداد الخلايا البكتيرية
Determination of Bacterial Cell Numbers

ليس بالضرورة أن تكون كل خلايا أية عشيرة بكتيرية من خلايا حية. وإنما فقط الخلايا الحية (viable = living) هي التي يكون لها القدرة على النمو على الآجار المغذي nutrient agar لتنتج مستعمرات colonies، أو تلك التي تنمو كمعلق في وسط غذائي سائل. أما الطريقة التي تقدر العد الحيوي viable counting فهي التي تقدر عدد الخلايا الحية في العشيرة، على حين أن العد الكلي للخلايا total cell counting إنما يقيس الخلايا الحية وغير الحية أو المطلوبة.

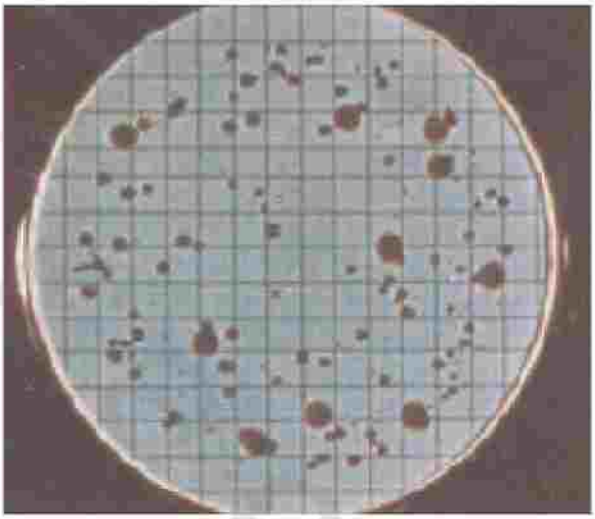
العد الكلي للخلايا Total Cell Count

١- إن الطريقة الأكثر استخداما لتقدير العد الكلي للخلايا تتضمن العد enumeration باستخدام المجهر، حيث يتم حصر عدد الخلايا الموجودة في طبقة رقيقة من الآجار الموضوعة في غرفة عد ذات حجم معلوم وحيث يكون عمق هذه الحجرة ٠,٠٢ مم ومساحتها ٠,٠٥ مم٢ ويجب أن تضرب في ٢×١٠^{٧} لتعطي العد الكلي للخلايا في كل مل. وهذه الشريحة تسمى شريحة عد الدم أو شريحة نيوباور Newbouer.

٢- العد منسوباً لحجم معلوم من الدقائق الصغيرة، على سبيل المثال خلايا الدم الحمراء (٥×١٠^{٦}/مل).

٣- بالعداد الإلكتروني وعداد كولتر Coulter counter، والذي سهل كثيراً العد الكلي الذي يعتمد على فقد التوصيل لمحلول إلكتروني والذي ينشأ نتيجة مرور بكتيريا (أو أية دقائق صغيرة) خلال فتحة ضيقة.

٤- طريقة الترشيح الغشائي membrane filtration بالنسبة للأعداد الأقل من ١٠٢/مل، حيث تمرر كمية معلومة من مياه البحيرات أو مياه الشرب خلال غشاء ترشيح والذي يجفف بعد ذلك ويصبغ ثم يتم إزالة الصبغة الزائدة ليصبح الغشاء شفافاً ويفحص تحت المجهر لعد الخلايا المصبوغة على الغشاء (بالنسبة لمساحة معلومة من الغشاء). ويبين الشكل رقم (٦٩) طريقة عد مستعمرات البكتيريا والفطريات.



الشكل رقم (٦٩). طريقة عد مستعمرات البكتيريا والفطريات. (عن: Prescott, *et al.*, 1999).

العد الحيوي Viable Counts

وتتضمن هذه الطريقة عد المستعمرات الناتجة بواسطة الخلايا الحية وذلك تحت توفر الظروف الملائمة للنمو. وتبعاً لطريقة كوخ لعد الأطباق المصبوبة pour-plate method، حيث يتم عمل تخفيفات مناسبة لمعلق في وسط سائل ويخلط مع الآجار المغذي عند درجة حرارة ما بين ٤٠-٤٥°م (كي يظل الآجار منصهراً) وتصب في أطباق بتري ويسمح لها بالاستقرار والتصلب solidification. كما يمكن ايضاً أن ينشر spread المعلق على سطح آجار متصلب في طبق بتري وذلك بواسطة موزع spreader معقم أو ملعقة مثلثة (يمكن أن تعمل على لهب خاص من سيقان زجاجية مصمتة). بديلاً عن ذلك، يمكن وضع الخلايا الميكروبية على غشاء مرشح membrane filter والذي يمكن بعدئذ أن يوضع على آجار مغذي أو على بطاقات مغطاة بوسط مغذي nutrients coated cards. وفي جميع الحالات السابقة، يتم عد المستعمرات الناتجة بعد التحضين المناسب للبيئة المغذية المزروع عليها. وتعد هذه الطرق مناسبة فقط لعد المعلقات المتجانسة لأي سلالة أو نوع ولكنها لا تعد مناسبة لعد الخلايا المفردة للأنواع المختلفة في تعداد مختلط.

وبالنسبة للأحياء الدقيقة الأكبر حجماً من البكتيريا، مثل الأوليات، والطحالب والخمائر، فيمكن عدها مباشرة بواسطة عدادات إلكترونية مثل عداد كولتر Coulter counter حيث يدفع بالقوة المعلق الميكروبي خلال ثقب أو فتحة

orifice صغيرة. ثم ينساب تيار كهربي خلال الفتحة ويوضع القطبان الكهربيان (electrodes) على جانبي الفتحة لقياس المقاومة الكهربية. وفي كل وقت تمر فيه خلية بكتيرية خلال الفتحة تزيد المقاومة الكهربية (أو أن التوصيل يتناقص) ويتم عد الخلايا، ويعطي عداد كولتر نتائج دقيقة مع الخلايا الأكبر ويستخدم على نطاق واسع في المستشفيات لعد خلايا الدم الحمراء والبيضاء. وليس مفيداً بنفس الدرجة في عد البكتيريا بسبب تداخل فضلات الجزيئات الصغيرة أو تكوين خيوط وغيرها.

تقدير الكتلة الميكروبية
Determination of Microbial Mass

تعد طرق تقدير كتلة الأحياء الدقيقة وسيلة لقياس النمو ومعدلاته في كل أنواع الأحياء الدقيقة وإن كانت أكثر انتشاراً في دراسة نمو البكتيريا. وتقاس الكتلة الرطبة wet أو الجافة dry. أما عند تقييم النشاط الأيضي أو الإنزيمي فإنه من المفضل قياس محتوى البروتين أو النيتروجين للمعلق البكتيري أو المزرعة الميكروبية. وتنقسم هذه الطرق إلى :

١- الطرق المباشرة Direct Methods

أ) تقدير الوزن الرطب عقب الطرد المركزي centrifugation وعقب تجفيف الخلايا المترسبة بالطرد المركزي إلى وزن ثابت ويمكن بعدها تقدير الوزن الجاف.

ب) المحتوى الكلي للنيتروجين بواسطة جهاز كيلدال Kieldahl أو تقدير الكربون الكلي وهي طريقة دقيقة.

ج) في التقديرات الروتينية يمكن تقدير كمية البروتين مثل طريقة فولين – لاواري (Folin-Lowary).

٢- الطرق غير المباشرة Indirect Methods

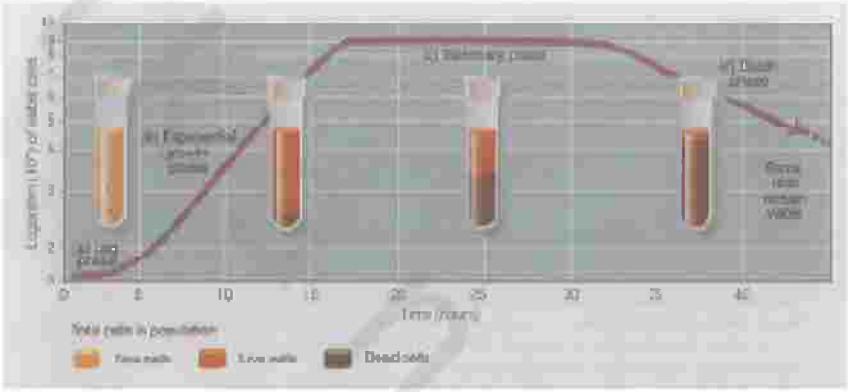
أ) تعد طرق قياس العكارة turbidity لمعلقات الخلايا الميكروبية مفيدة جداً في قياس النمو الميكروبي. ويتم عادة قياس الكثافة الضوئية optical density (O.D) في جهاز سبكتروفوتوميتر spectrophotometer أو العكارة turbidity سواء بواسطة الجهاز السابق ذكره أو بواسطة جهاز قياس العكارة tubrbidimeter أو أحياناً بواسطة جهاز نيفلومتر Nephlometer الذي يكون أكثر دقة.

ب) قياس بعض الوظائف الأيضية ذات العلاقة المباشرة بالنمو مثل : أخذ الأوكسيجين أو إنتاج ثاني أكسيد الكربون أو إنتاج أحماض. وتعد مثل هذه القياسات مفيدة حيث لا تكون الطرق الأخرى مفيدة وبخاصة في أعداد الخلايا الصغيرة. ويمكن إجراء قياس الوظائف الأيضية بطرق مختلفة.

منحنى النمو
The Growth Curve

يتم دراسة نمو العشيرة population عن طريق تحليل ما يسمى منحنى النمو growth curve للمزرعة الميكروبية. وعند تنمية الأحياء الدقيقة في وسط غذائي سائل، فإنها تنمو عادة فيما يطلق عليها المزرعة الساكنة أو مزرعة

القطفة batch culture، وهي عبارة عن نظام مغلق closed system — بمعنى أنها تحضّن في أوعية مزارع مغلقة مع قطفة أو كمية واحدة ثابتة من الوسط الغذائي. وبسبب عدم إمداد هذه المزرعة بأي وسط غذائي آخر طازج أثناء فترة التحضين، فإن تركيز المواد المغذية يتناقص ويتزايد تركيز الفضلات الناتجة عن الأيض الميكروبي. لذلك فإن نمو الأحياء الدقيقة التي تتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط يمكن أن يرسم ويعبر عنه على شكل لوغاريتم لعدد الخلايا في مقابل زمن التحضين، وهذا الرسم البياني يعطي شكلاً مميزاً (شكل منحنى النمو .. انظر الشكل رقم ٧٠) إلى أربعة أطوار هي الطور المتأخر lag phase، وطور النمو الطردي أو اللوغاريتمي log or exponential phase، وطور الثبات stationary phase، وطور الانحدار أو الموت decline or death phase وذلك على النحو التالي كما يحدث في المزارع البكتيرية:



الشكل رقم (٧٠). منحنى نمو العشيرة البكتيرية بين لوغاريتم أعداد الخلايا الحية بالنسبة لوقت التحضين مبيناً: (a) الطور المتأخر lag phase، (b) طور النمو الطردي exponential phase، (c) طور الثبات أو السكون stationary phase (d) وأخيراً طور الانحدار decline أو طور الموت death phase (عن: Alcamo, 2001).

١- الطور المتأخر Lag Phase

وأثناء هذا الطور وفي فترة التحضين المبكرة للمزرعة لا تتزايد أعداد البكتيريا المحقونة في الوسط الغذائي ولكن ربما تتناقص الأعداد مبدئياً إلى أن تتكيف هذه الخلايا مع الوسط الجديد بظروفه، عندئذ، وأثناء هذه الفترة فإن البكتيريا تجهز نفسها للتكاثر وذلك بتخليق ح ن د (د.ن.أ DNA) و ح ن ر (ر.ن.أ RNA) والبروتينات والإنزيمات والجزيئات الكبيرة، أي كل احتياجاتها اللازمة لحدوث الانقسام الخلوي.

كما أن هذه الخلايا قد تكون قديمة (مسنة) ومن ثم مستنزفة من أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP وعوامل النمو الأساسية والريبوزومات، والتي يلزم تخليقها من قبل أن يبدأ النمو. كما قد يكون وسط النمو مختلفاً عن ذلك الذي إعتاد الكائن الدقيق النمو فيه. وهنا لابد من تخليق إنزيمات تستطيع الاستفادة من المواد المغذية الجديدة. ومن الممكن أن تكون خلايا الأحياء الدقيقة قد تعرضت للعطب وتحتاج للشفاء منه.

ويتباين الزمن الذي يستغرقه الطور المتأخر بشدة باختلاف ظروف الأحياء الدقيقة وطبيعة الوسط الغذائي، فقد يكون هذا الطور طويلاً إذا كان محقن inoculum الكائن الدقيق من مزرعة قديمة أو مخزنة في الثلاجات. كما ينتج أيضاً استطالة لهذا الطور إذا كان الوسط الغذائي المحقون به الخلايا مختلفاً من ناحية التركيب الكيميائي. ومن ناحية أخرى، فعند حقن مزرعة حديثة العمر نامية في الطور الطردي اللوغاريتمي في وسط غذائي طازج له نفس التركيب، فإن الطور المتأخر يصبح قصيراً أو يتلاشى.

٢– الطور الطردي أو اللوغاريتمي Exponential or Log Phase

يلي الطور المتأخر طوراً ثانياً يسمى بالطور اللوغاريتمي logarithmic (log) phase، وذلك لأن الكتلة الحيوية للبكتيريا تتزايد طردياً exponentially مع الوقت، كما يصل معدل التكاثر البكتيري إلى أقصاه تحت ظروف النمو المحددة أو المتاحة. وأنه خلال هذه الفترة يمكن تحديد عمر الجيل generation time، حيث إن معدل النمو يظل ثابتاً خلال هذا الطور، أي أن الأحياء الدقيقة تكون منقسمة وتتضاعف أعدادها على فترات منتظمة. وبسبب أن كل فرد (خلية) ينقسم عند لحظة مختلفة قليلاً عن غيره، لذلك فإن منحنى النمو يرتفع برقة وليس في قفزات متباعدة. ويلاحظ أن عشيرة النمو تكون في أقصى توحدها وتجانسها من ناحية خواصها الكيميائية والفسيولوجية، ولهذا السبب تستخدم عادة المزارع في الطور اللوغاريتمي لدراسة الخواص الكيميائية والفسيولوجية للكائن.

٣– طور الثبات Stationary Phase

يبدأ طور الثبات (السكون) بنهاية الطور اللوغاريتمي عندما لا تستطيع أن تنقسم الخلايا. وكما أن معدل النمو يعتمد على عوامل كثيرة من بينها تركيز مادة الوسط substrate (أي تركيز المواد المغذية)، وبسبب تناقصها أثناء الطور اللوغاريتمي فإن هذا يسبب تناقصاً لمعدل النمو حتى من قبل أن تستهلك المواد المغذية. ولهذا السبب فإن الانتقال من الطور اللوغاريتمي إلى طور الثبات يكون تدريجياً. وعلاوة على استهلاك المواد الغذائية من وسط النمو، فإن عوامل أخرى تجعل أعداد الخلايا ثابتة على مدى فترة طويلة من الزمن. ومن بين هذه العوامل الأخرى التركيزات العالية جداً للخلايا؛ وتراكم المواد السامة والمواد التي تقلل من معدل النمو ومن ثم يؤدي كل ذلك إلى ظهور طور الثبات أي تظل أعداد الخلايا ثابتة لأن عدد الخلايا الناتجة عن الانقسام تساوي عدد الخلايا الميتة. وقد يحدث أثناء طور الثبات في أعداد الخلايا الميكروبية أن تستهلك المواد المخزنة كما قد تتكسر أعداداً من الريبوزومات، كما قد تستمر عملية تخليق الإنزيمات. وتعتمد هذه العمليات المختلفة على طبيعة العامل المحدِّد للنمو growth limiting factor. وتموت الخلايا الحساسة فقط بسرعة، وطالما أن الطاقة اللازمة لإبقاء الخلايا يمكن أخذها من المواد المخزنة أو البروتين، فإن الخلايا قد تظل حية لفترة طويلة.

وفي كل العمليات الميكروبية التي تستهدف تكوين متأيضات ثانوية secondary metabolites (مثل إنتاج البنيسيللين)، فإن طور الثبات هو الطور المنتج حقيقياً لهذه المادة وغيرها من المتأيضات الثانوية. ولهذا السبب فإنه في التقنية الحيوية biotechnology يتم التفريق بين ما يسمى طور التغذية trophophase وطور الإنتاج idiophase، فعلى الرغم من أن الخلايا لم تعد قادرة بعد على الانقسام فإنها تستطيع أن تستفيد من أي مادة وسط (مادة تغذية) مضافة وتدخلها كمواد أصولية precursors في المنتج النهائي. ويطلق على الكتلة البكتيرية المخلّقة عند وصولها إلى طور الثبات ما يعرف بالمحصول (الناتج yield) والذي يعتمد على كميات وطبيعة المواد المغذية وعلى عوامل المزرعة.

٤- طور الانحدار أو الموت Decline or Death Phase

بعد فترة معينة من طور الثبات (على حسب كل كائن وظروف البيئة) تتناقص أعداد الكائن الحي الدقيق ويصبح معدل الموت أكثر من معدل الانقسام (التكاثر)، ولذلك نجد أن منحنى النمو يصل إلى حد الانحدار وتتناقص الخلايا بمعدل يكاد يكون مناظراً لمعدل النمو في الطور اللوغاريتمي ولكنه في اتجاه الموت. ويظل هذا النمط ثابتاً عندما يصبح العدد الكلي للخلايا ثابتاً ويرجع ذلك ببساطة إلى أن الخلايا تفشل في التحلل بعد الموت. ولمعرفة ما إذا كانت خلايا الكائن الدقيق لا زالت حية أو ميتة يلزم لذلك زراعتها وتحضينها في وسط غذائي طازج أو إجراء العد الحيوي لها.

وعلى الرغم من أن معظم العشائر الميكروبية تموت عادة بنمط لوغاريتمي، إلا أن معدل الموت قد يتناقص بعد أن تكون الأعداد قد تناقصت بشدة. ويرجع هذا إلى استطالة فترة البقاء حية survival أو لظهور خلايا أكثر مقاومة.

وكما سبق فإن من أسباب موت الخلايا في هذا الطور هو استنزاف المواد الغذائية وظهور المواد السامة والتغير في ظروف بيئة النمو.

زمن الجيل Generation Time

ينقسم الكائن الحي الدقيق على فترات ثابتة أثناء طور النمو الطردي (اللوغاريتمي) وبهذا يتضاعف تعداد الكائن أثناء فترة زمنية محددة تسمى زمن الجيل generation time أو زمن التضاعف doubling أي الزمن الذي تتضاعف فيه عدد وحدات الكائن الحي لتعطي جيلاً واحداً يتكرر بنفس الطريقة وفي نفس الفترة الزمنية مثل الجيل الأول.

فلو فرضنا أن مزرعة في أنبوبة محقونة بخلية واحدة تنقسم كل ٢٠ دقيقة، فإن التعداد سوف يصبح خليتين بعد ٢٠ دقيقة، ٤ خلايا بعد ٤٠ دقيقة وهكذا، وبسبب أن التعداد يتضاعف في كل جيل، فإن الزيادة في التعداد تكون ٢ن حيث إن ن هو عدد الأجيال. وبذلك تكون الزيادة الناتجة في التعداد طردية أو لوغاريتمية (الجدول رقم ١١).

الجدول رقم (١١). مثال للنمو الطردي وزمن الجيل.

الوقت (دقيقة)	عدد الانقسامات	$٢^{ن}$	التعداد ($ن_{صفر} \times ٢^{ن}$)	لوغاريتم ^{١٠}ز
صفر	صفر	$٢^{صفر} = ١ = ١$	١	صفر
٢٠	١	$٢ = ٢^{١}$	٢	٠,٣٠١
٤٠	٢	$٤ = ٢^{٢}$	٤	٠,٦٠٢
٦٠	٣	$٨ = ٢^{٣}$	٨	٠,٩٠٣
٨٠	٤	$١٦ = ٢^{٤}$	١٦	١,٢٠٤
١٠٠	٥	$٣٢ = ٢^{٥}$	٣٢	١,٥٠٥
١٢٠	٦	$٦٤ = ٢^{٦}$	٦٤	١,٨٠٦

النمو الميكروبي في المزرعة المستمرة

Microbial Growth in Continuous Culture

يحدث تغيراً مستمراً في ظروف نمو مزرعة القطفة (الساكنة: المستمرة) batch culture بحيث تظهر زيادة في أعداد الكائن النامي وتناقصاً في تركيز مواد الوسط (المواد المغذية). ويهدف عمل دراسات فسيولوجية عديدة يكون من المفضل فيها الاحتفاظ بخلايا الكائن على مدى أطول فترة ممكنة تظل أثنائها تركيزات ومكونات الوسط الغذائي ثابتة وبحيث تنمو الخلايا أثناءها عند معدل طردي exponential rate. ويمكن إحداث ظروف تقريبية من هذا الوضع عن طريق النقل المستمر لخلايا المزرعة إلى وسط الإضافة المستمرة لوسط النمو الجديد إلى عشائر الخلايا النامية مع مصاحبة ذلك بسحب حجم مساوي من المزرعة. وهذا هو أساس المزرعة المستمرة التي يتم إجراؤها إما عن طريق الثبات الكيميائي chemostat وإما عن طريق الثبات التعكيري turbidostat.

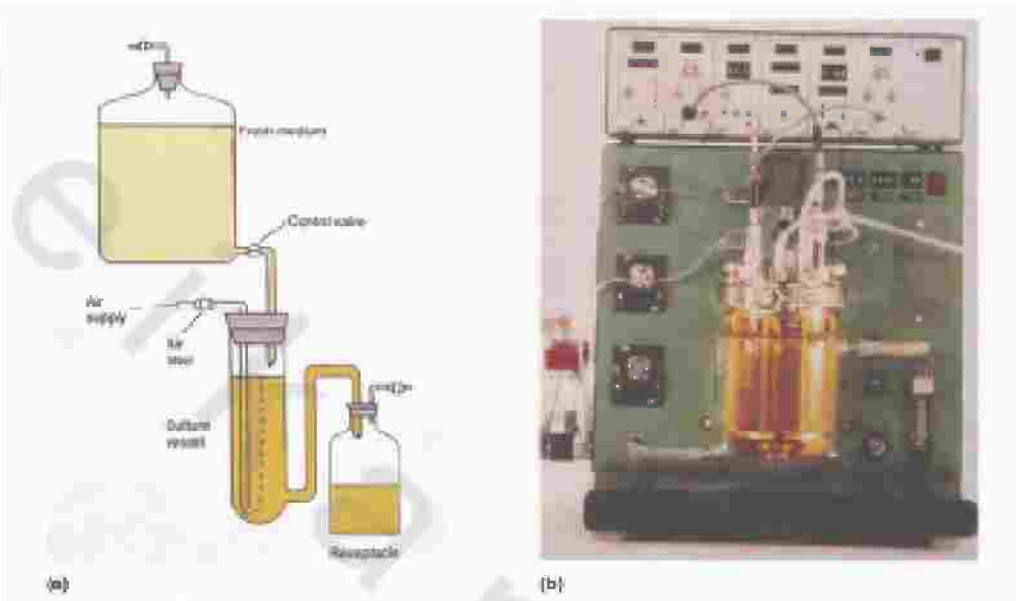
١- مزرعة الثبات الكيميائي The Chemostat Culture

يتم تشييد مزرعة الثبات الكيميائي بحيث يغذي الوسط الغذائي وعاء المزرعة بمعدل ثابت ومساوي لإزالة وسط النمو القديم الموجود به الكائنات الحية الدقيقة كما هو موضح بالرسم التخطيطي وبصورة للجهاز في الشكل رقم (٧١). ويتكون الوسط الغذائي لعملية الثبات الكيميائي من عنصر غذائي أساسي، مثل نوع معين من الأحماض الأمينية، والذي يوجد بكميات محدّدة limiting quantities. وبسبب وجود عنصر غذائي محدّد، فإن معدل النمو يتم تقديره عن طريق معدل إضافة (تغذية) وسط النمو في حجرة النمو، كما تعتمد الكثافة النهائية للخلايا على تركيز عنصر التغذية المحدّد. ويعبر عن معدل تبادل العناصر الغذائية بالرمز D، ومعدل انسياب الوسط خلال وعاء المزرعة بالرمزF (مل/ساعة) ومنسوب إلى حجم الوعاء (مل) وبذلك فإن:

$$\text{معدل التخفيف} = \frac{\text{معدل انسياب الوسط (مل/ساعة)}}{\text{معدل الانسياب منسوباً إلى حجم الوعاء}}$$

أي أن:

$$D = \frac{F}{V}$$



الشكل رقم (٧١). نظام المزرعة المستمرة والثبات الكيميائي Chemostat: a) رسم تخطيطي للنظام؛ b) مخمر تجاري commercial fermentor يعمل بنظام الثبات الكيميائي (عن: Prescott, *et al.*, 1999).

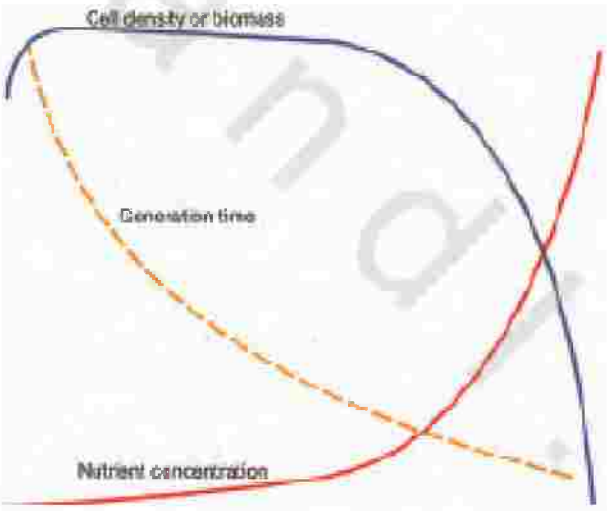
وينسب كلّ من مستوى التعداد الميكروبي وزمن الجيل إلى معدل التخفيف وتبقى كثافة التعداد الميكروبي ثابتة على مدى معدلات تخفيف كبيرة. ويتناقص زمن الجيل (أي يرتفع معدل النمو) كلما زاد معدل التخفيف. وتحت مثل هذه الظروف فإن العامل الغذائي المحدِّد سوف يُستنزف تحت هذه الظروف المتوازنة. أما إذا إرتفعت معدلات التخفيف بدرجة كبيرة جداً، فإن الكائن الدقيق يختفي من وعاء المزرعة من قبل أن يتكاثر لأن معدل التخفيف يكون أكبر من معدل النمو الأعظم. ويرتفع تركيز العامل الغذائي المحدِّد عند معدلات التخفيف الأعلى بسبب وجود أعداد أقل من الكائن الدقيق فلا تستطيع أن تستغله.

وعند معدلات التخفيف المنخفضة جداً فإن الزيادة في معدل التخفيف يسبب زيادة في كلٍ من كثافة الخلايا ومعدل النمو. ويرجع سبب ذلك إلى زيادة تأثير تركيز العامل المغذي على معدل النمو. وعند التخفيفات المنخفضة يكون المصدر الغذائي المتاح منخفضاً ويكفي فقط لإنتاج طاقة الحفاظ maintenance energy للكائن الحي. أما بزيادة معدلات التخفيف فإن كمية المواد المغذية ترتفع ومن ثم كثافة الخلايا النامية لأن الطاقة المتوفرة تكفي كلاً من المحافظة على الكائن وكذلك نموه (انظر الشكل رقم ٧٢).

٢- مزرعة ثبات العكارة The Turbidostat Culture

وهي النوع الثاني لنظام المزارع المستمرة والتي تتضمن وجود خلية ضوئية photocell لقياس الامتصاص absorbance أو العكارة turbidity للمزرعة وهي لا زالت في وعاء النمو. ويتم تنظيم معدل انسياب flow rate الوسط الغذائي خلال الوعاء تلقائياً automatically للحفاظ على العكارة أو كثافة الخلايا التي كان قد تم تقديرها مسبقاً. وتختلف مزرعة ثبات العكارة عن مزرعة الثبات الكيميائي في عدة نواحي. أولها أن معدل التخفيف في مزرعة ثبات العكارة يتباين ولا يبقى ثابتاً، كما أن الوسط الغذائي فيها يتقصه العامل الغذي المحدد limiting. وتعمل مزرعة ثبات العكارة جيداً عند معدلات التخفيف العالية، على حين أن مزرعة الثبات الكيميائي تكون ثابتة غالباً وفعالة عند معدلات التخفيف المنخفضة.

وتعد نظم المزارع المستمرة مفيدة جداً لأنها توفر مدداً supply مستمراً من الخلايا في طور النمو الطردي والتي تنمو عند معدل معلوم. وهي بهذا تسهل دراسة النمو الميكروبي عند مستويات غذائية منخفضة جداً أو عند تركيزات قريبة من تلك الموجودة في البيئات الطبيعية. وتعد هذه النظم أساسية في مجالات عديدة من الأبحاث مثل: دراسة التفاعلات بين الأنواع الميكروبية تحت الظروف البيئية التي تماثل تلك الموجودة في بحيرات الماء العذب.



الشكل رقم (٧٢). معدل تخفيف الثبات الكيميائي والنمو الميكروبي. لاحظ تأثيرات التغير في معدل التخفيف على الثبات الكيميائي (عن: Prescott, *et al.*, 1999).

النمو المتوازن وغير المتوازن Balanced and Unbalanced Growth

يكون النمو الطردي exponential growth، سواء في مزارع القطفة batch أو المزارع المستمرة continuous عبارة عن نمو متوازن balanced، بمعنى أنه يتم تصنيع المكونات الخلوية عند معدلات ثابتة مقارنة ببعضها. أما إذا تغيرت مستويات المواد المغذية nutrients أو الظروف البيئية الأخرى فإن هذا يؤدي إلى نمو غير متوازن unbalanced بالنسبة لبعضها بعض بسبب الاختلاف في معدلات تخليق مكونات الخلية حتى تصل إلى حالة ثبات جديدة. وتلاحظ هذه

الاستجابة بسهولة في تجارب التغيير shift up experiments والتي تنقل فيها البكتيريا من وسط فقير غذائياً إلى وسط أغنى. وفي هذه الحالة تبني الخلايا أولاً ريبوزومات جديدة لتحسين قدرتها على تخليق البروتين، ويعقب هذا زيادة في تخليق البروتين و ح ن د (د.ن.أ = DNA). وأخيراً، فإن الارتفاع المتوقع في معدلات التكاثر يأخذ طريقه.

كما ينتج أيضاً النمو غير المتوازن عندما يتم تغيير العشيرة البكتيرية إلى وضع متدني من وسط غني إلى آخر فقير. حيث تكون الكائنات في الوضع السابق قادرة على الحصول على العديد من مكونات الخلايا مباشرة من الوسط. أما عند تغييرها إلى وسط يكون غير مناسب غذائياً، فإنها تحتاج إلى وقت لتصنيع الإنزيمات اللازمة لتخليق المغذيات غير المتاحة. ومن ثم فإن الإنقسام الخلوي وتكاثر ح ن د (د.ن.أ = DNA) يستمران بعد التغيير إلى الوسط الأفقر، ولكن يكون صافي تخليق البروتين و ح ن ر (ر.ن.أ = RNA) بطيئين، وتصبح الخلايا أصغر، وتتعرف على بعضها أيضاً حتى تصبح قادرة على النمو مرة أخرى ومن ثم تستأنف النمو المتوازن ثانية.

وتبين تجارب الوسط الأعلى أو الأدنى أن النمو الميكروبي يكون تحت تحكم متآزر coordinated control وتستجيب سريعاً للتغيرات الحادثة في البيئة.

العوامل البيئية المؤثرة على النمو
The Influence of Environmental Factors on Growth

تتأثر كثيراً معدلات النمو والموت للأحياء الدقيقة بعدد من العوامل الكيميائية والفيزيائية الموجودة بالبيئة. وتكون بعض هذه العوامل البيئية في صالح النمو الميكروبي السريع على حين أن بعضها لا يسمح بالنمو الميكروبي أو يثبطه. ومن الملاحظ أن الظروف التي تسمح بنمو كائن دقيق معين قد تعوق نمو كائن آخر. كما أنه ليس لكل الميكروبات القدرة على النمو تحت الظروف المتطابقة identical، فلكل كائن دقيق مدى نوعياً من التحمل specific tolerance range لعوامل بيئية معينة. وخارج حدود الظروف البيئية التي يمكن تحتها أن يتكاثر كائن دقيق معين، فهو إما أن يناضل للعيش (للبقاء) survive، بدخوله في حالة سكون dormant state نسبية أو أن يفقد حيويته viability، بمعنى أنه يفقد قدرته على التكاثر ومن ثم يموت.

وسواء في المعمل أو تحت الظروف الطبيعية، فإن بعض العوامل البيئية أو تفاعلاتها تتحكم control في معدل النمو والموت لأي نوع محدّد من الأحياء الدقيقة. ففي الطبيعة، وحيث تكون الظروف غير متحكم فيها، وحيث تتعايش معاً coexist العديد من الأنواع فإن التغير أو التذبذب fluctuation في الظروف البيئية يشجع أو يؤثر في تغيرها shifts في أعداد الأحياء الدقيقة نتيجة لمعدلات النمو المتباينة بين أعداد كل نوع من الأحياء الدقيقة داخل هذه الجماعة community في الموقع المعين.

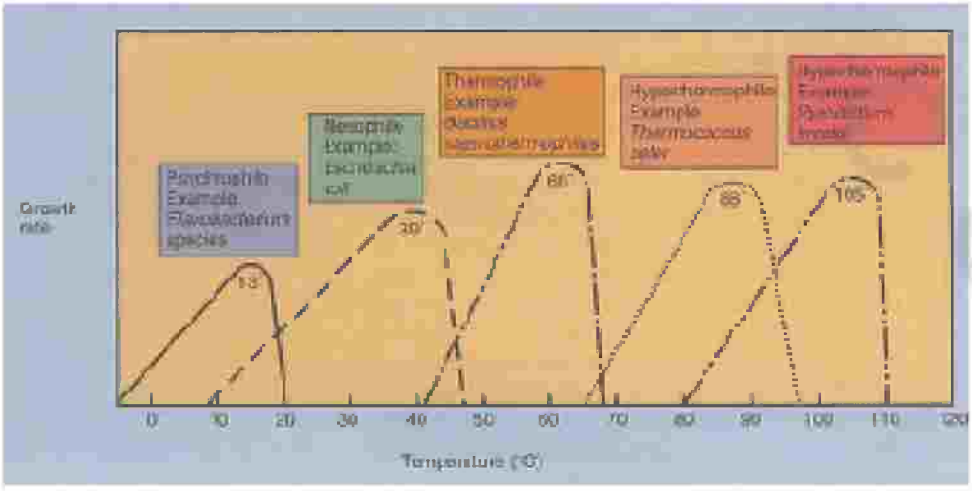
أما في المعمل، فإنه من الممكن ضبط وتعديل وتكييف الظروف حتى تصل إلى معدلات النمو المثلي optimum لأي كائن من الأحياء الدقيقة. وبنفس الطريقة، فإنه في المخمِّرات الصناعية industrial fermentors يمكن ضبط هذه الظروف لتصبح مثلي لمعدل النمو الميكروبي، وبهذا يتحقق أقصى تراكم accumulation للنواتج الأيضية الميكروبية المرغوب فيها.

وتستخدم العديد من المعامل والصناعات التطبيقية مزارع نقية من الأحياء الدقيقة، وبذلك يمكن ضبط ظروف النمو التي تشجع على النمو الأمثل للكائن الدقيق المعين.

وعلى الرغم من أن معظم الأحياء الدقيقة تنمو فقط تحت ظروف بيئة معتدلة تماماً، إلا أن قدرة البعض منها على التكيف على البيئات المتطرفة وغير المشجعة على النمو تكون واضحة بشكل ظاهر. ويبدو أن لبعض البكتيريا، مثل باسيللاس إنفرناس *Bacillus infernus* القدرة على أن تعيش على مسافة ١.٥ ميل تحت سطح الأرض من دون وجود أوكسيجين وعند درجة حرارة أعلى من ٦٠°م. ويطلق على مثل هذه الأحياء الدقيقة التي تنمو في مثل هذه الظروف القاسية الكائنات المحبة للتطرف extremophiles ومن بين العوامل البيئية المؤثرة على نمو الأحياء الدقيقة ما يلي :

١- تأثير درجة الحرارة The Effect of Temperature

تعد درجات الحرارة أهم العوامل المؤثرة على معدلات نمو الأحياء الدقيقة وكذلك على موتها ونظراً إلى وجود درجة حرارة دنيا minimum، أي أقل درجة ينمو عندها الكائن الحي الدقيق ، وأيضاً درجة حرارة قصوى maximum، وهي أعلى درجة حرارة يمكن أن ينمو عندها الكائن، لذلك فإن هذا قد جعل هناك ما يسمى مدى درجات الحرارة للنمو temperature growth range لكل كائن ولكل مجموعة من الكائنات. وتقتل معظم الأحياء الدقيقة عندما تتعرض لدرجة حرارة أعلى من الدرجة القصوى. أما عند درجة الحرارة المنخفضة جداً فإنه مع ذلك، يتوقف الأيض الميكروبي مبقياً هذه الأحياء في حالة كمون dormant state. وبناءً عليه، يمكن حفظ العديد من الأحياء الدقيقة إلى مالا نهاية وذلك بتجميدها في النيتروجين السائل (-١٩٦°م). وتستخدم هذه الطريقة في حفظ تجمعات المزارع culture collections (المزارع المحفوظة) كأصول مرجعية reference stocks إلى وقت الاحتياج لها. ويبين الشكل رقم (٧٣) تأثير درجات الحرارة على معدلات النمو وعلى أنواع الميكروبات بالنسبة لدرجات الحرارة.



الشكل رقم (٧٣). رسم تخطيطي لبيان تأثير درجات الحرارة على معدلات النمو وعلى أنواع الميكروبات بالنسبة لدرجات الحرارة.

وتوجد خلال مدى النمو لكل كائن درجة حرارة مثلى للنمو حيث يحدث عندها أعلى معدل للتكاثر. وتعرف درجة الحرارة المثلى بأنها تلك الدرجة التي ينمو عندها الكائن بأعلى معدل نمو maximal growth rate (أي أقصر وقت للجيل)، ولكن ليس لإعطاء أعلى ناتج من الخلايا. ففي بعض الأحيان يمكن حدوث أعلى عدد من الخلايا أو ناتج عند درجات حرارة أقل أو أعلى. وفي المعمل فإن الحضّانات incubators (أي غرف أو أجهزة تكون درجة الحرارة محكومة بها) تستخدم عادة لتوفير الظروف التي تسمح بنمو المزرعة الميكروبية عند درجات الحرارة التي تسمح بأقصى معدلات نمو فقط ولكل كائن من الأحياء الدقيقة درجة الحرارة المثلى له.

وتسمى الكائنات التي يحدث لها أحسن نمو عند درجات الحرارة المنخفضة كائنات محبة للبرودة psychrophiles، وهي التي تكون درجة حرارتها المثلى أقل من ٢٠°م. ويكون لبعض محبات البرودة القدرة على النمو حتى عند أقل من درجة الصفر المئوي طالما أن الماء لا يزال متاحاً لها. وتوجد عادة الكائنات المحبة للبرودة في البحار والمناطق القطبية، كما أن تجميد المواد الغذائية الملوثة بالميكروبات قد لا يقتلها وبذلك تسبب أمراضاً أو تسمماً غذائياً عند استعمالها. وتوجد بعض الأحياء الدقيقة في قمم الجبال الثلجية وفي الجليد.

أما غالبية الأحياء الدقيقة فإنها تنمو بين درجة ١٥–٤٥°م وهي بذلك تسمى وسطية الحرارة mesophiles. أما الأحياء الدقيقة التي يبدأ نموها من فوق ٤٠°م فإنها تسمى محبة للحرارة thermophiles. وللكثير من الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة درجات مثلى للنمو تتراوح مابين ٥٥–٦٠°م. وتوجد الكائنات الدقيقة في الينابيع الحارة وأيضاً في مجاري الغسيل التي تعمل بالماء الحار. وقد وجد حديثاً أن بعض أنواع البكتيريا بإمكانها أن تنمو عند درجة ١٠٠°م، وتوجد مثل هذه الكائنات في أعماق المحيطات بالقرب من التصدعات الحرارية thermal rifts التي تظل المياه فيها حارة مع احتفاظها بحالة السيولة نتيجة للضغط العالي. وأغلب محبات الحرارة من البكتيريا إضافة إلى قليل من الطحالب والفطريات وتزدهر في بيئات عديدة تشمل السباخ (السماد البلدي compost) وكتل القش hay المولدة ذاتياً للحرارة وأنابيب المياه الساخنة والينابيع الحارة. وتختلف محبات الحرارة عن وسطية الحرارة في كونها تمتلك إنزيمات مقاومة للحرارة ونظم تخليق البروتين القادرة على العمل عند درجات الحرارة العالية. كما أن دهون أغشيتها تكون أيضاً أكثر تشبعاً عن تلك الموجودة بوسطية الحرارة وذات درجات انصهار أعلى، ولهذا السبب تظل أغشية محبات الحرارة سليمة عند درجات الحرارة العالية.

وتسمى البكتيريا التي يحدث نموها الأمثل ما بين ٨٠–١١٣°م المحبة لدرجة الحرارة الفائقة hyperthermophiles وهي لا تنمو عادة في درجة ٥٥°م. ومن أمثلة ذلك بايروكوكاس أبيسي *Pyrococcus abyssi* وبايروديكتيام أو كيولتام *Pyrodictium occultum* التي توجد في المناطق الحارة لقاع البحر.

وتوجد أنواع من الأحياء الدقيقة هي في الأصل وسطية الحرارة ولكنها يمكن أن تنمو أو تزدهر عند درجات حرارة أعلى قد تصل إلى ٥٥°م وهذه ما تعرف باسم المتحملة للحرارة العالية thermotolerant.

٢- تركيز الأوكسيجين Oxygen Concentration

يعد الأوكسيجين من العوامل المهمة المؤثرة على نمو الأحياء الدقيقة بصفة خاصة ونعني بذلك تأثير تركيز الأوكسيجين الجزيئي O_2. على هذا الأساس تنقسم الأحياء الدقيقة إلى:

أ) كائنات هوائية Aerobes

ونحن نرادف بين الأوكسيجين والهواء، ولذلك نطلق على الكائنات التي تحتاج للأوكسيجين بأنها هوائية وأنها لا بد وأن تنمو في وجود الهواء ومن ثم يطلق عليها هوائية إجبارية obligate aerobes. ويعمل الأوكسيجين الجزيئي O_2 كمستقبل نهائي للإلكترون terminal electron acceptor لسلسلة نقل الإلكترون في التنفس الهوائي. علاوة على ذلك، فإن الأحياء الدقيقة حقيقية النواة الهوائية تستخدم O_2 في تخليق الإستيرولات sterols والأحماض الدهنية غير المشبعة.

ب) كائنات لاهوائية Anaerobes

أي التي تعيش في غياب الأوكسيجين وتنقسم إلى:

١- لا هوائية اختيارية Facultative anaerobes: وهي لا تحتاج للأوكسيجين للنمو ولكنها تنمو أفضل في وجوده.

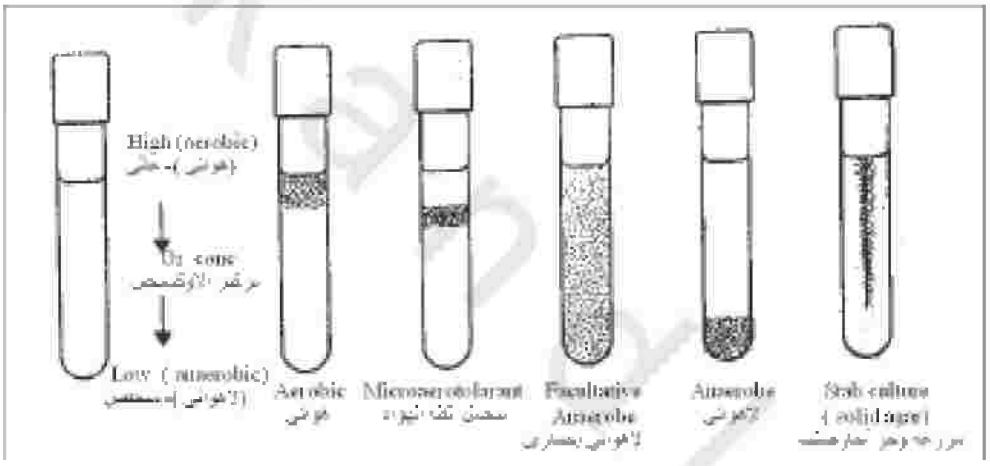
٢- لا هوائية متحملة للأوكسيجين Aeretolerant anaerobes مثل إنتيروكوكاس فيكاليز *Enterococcus faecalis* والتي ببساطة تتجاهل الأوكسيجين وتنمو جيداً بالتساوي سواء في وجوده أو غيابه.

٣- لا هوائية إجبارية Strict or obligate anaerobes: مثل باكتيرويدز *Bacteroides* وفيوزوباكتيريام *Fusobacterium* وكلوستريديام باستيريانام *Clostridium pasteurianum* وميثانوكوكاس *Methanococcus* التي لا تتحمل الأوكسيجين على الإطلاق وتموت في وجوده. ولا يمكن للكائنات اللاهوائية المتحملة للأوكسيجين والإجبارية أن تولد طاقة من خلال التنفس، ولكن يلزمها أن تستخدم التخمر أو مسارات التنفس اللاهوائي لهذا الغرض.

٤- كائنات القلة للهواء Microaerophiles: والتي يدمرها مستوى الأوكسيجين الجوي العادي (٢٠٪) ولكنها تحتاج لمستويات أدنى من ٢-١٠٪ حتى تنمو. مثال ذلك بكتيريا كامبايلوباكتر *Campylobacter*، وتحتاج كائنات القلة للهواء إلى مدى ضيق من تركيز الأوكسيجين، ولذلك فهي تحتاج لنموها إلى الأوكسيجين ولكنها تظهر معدلات قصوى من النمو فقط عند تركيزات الأوكسيجين المنخفضة لأن التركيزات الأعلى تسبب لها سُمِّية. وتحتوي مثل هذه الكائنات على إنزيمات تزيل السمية detoxifying enzymes منها. كما أن لكثير من الأحياء الدقيقة القدرة على إنتاج إنزيمات معينة تعالج بها الحالات السامة للأوكسيجين خاصة الأوكسيجين الثلاثي O_3 triplet الذي يتفكك إلى أوكسيجين جزيئي O_2 ومفرد singlet O، والأخير ضار أيضاً. وكذلك فإن تحويل الأوكسيجين إلى ماء يتوسطه تكوين فوق أوكسيجين $-O_2$ فضلاً عن الأوكسيجين المفرد.

ومن بين الإنزيمات التي تحمي الأحياء الدقيقة من صور الأوكسيجين الضارة إنزيم كتاليز catalase الذي يحول فوق أكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسيجين مفرد. أما إنزيم بيروكسيديز peroxidase فإنه يستخدم المرافق الإنزيمي نيكوتين أميدأدينين ثنائي النيوكليوتيدة المختزل reduced necotineamide adenine dinucledide (NADH) ليحول فوق أكسيد الهيدروجين إلى ماء. كذلك فإن شق فوق الأوكسيد يتحول إلى فوق أوكسيد الهيدروجين وماء بفعل إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز superoxide dismutase.

وقد تُظهر أية مجموعة ميكروبية أكثر من نوع من العلاقة بالنسبة للأوكسيجين. وتوجد كل الأنواع الخمسة في البكتيريا والأوليات. أما الفطريات فهي عادة هوائية، ولكن عدداً من أنواعها خاصة بين الخمائر – تكون اختيارية اللاهوائية. على حين أن الطحالب تكون دائماً وأبداً هوائية إجبارية، ويبين الشكل رقم (٧٤) العلاقة بين الأوكسيجين والنمو الميكروبي.



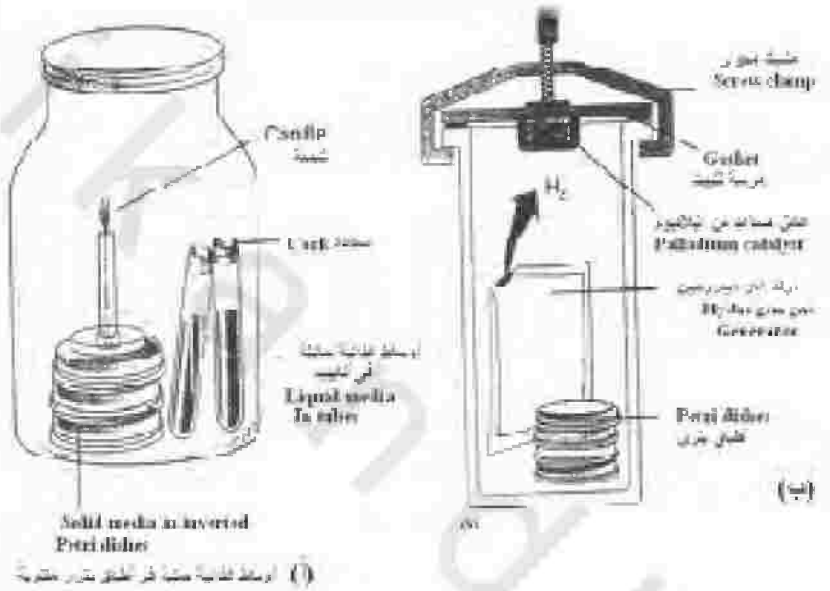
الشكل رقم (٧٤). استجابة النمو للميكروبات المختلفة للأوكسيجين عندما تنمو في وسط نمو شبه صلب أو في مزرعة شبه صلبة (١,٥ آجار). ويوجد التركيز الأعلى للأوكسيجين عند قمة الأنبوبة، على حين يكون أقل تركيز للأوكسيجين عند قاع الأنبوبة (عن: Ketchum, 1988).

وبسبب أن الكائنات الهوائية تحتاج للأوكسيجين O_2 على حين يقتل الكائنات اللاهوائية، لذلك فإن مداخلاً مختلفة جذرياً تكون مطلوبة لنمو نوعي لهذه الكائنات. فعندما يكون مطلوباً أحجام كبيرة من الأحياء الدقيقة الهوائية المزروعة cultured فإن وعاء المزرعة culture إما أن يرج shaked لتهوية الوسط وإما أن يلزم ضخ هواء معقم داخل وعاء المزرعة. وعلى العكس تماماً بالنسبة لأقصى نمو مطلوب عند زراعة الكائنات اللاهوائية، فإنه لابد من استبعاد الأوكسيجين. ويتم إستبعاد الأوكسيجين بعدة طرق منها:

١- باستخدام أوساط غذائية لاهوائية نوعية تحتوي على عوامل مختزلة مثل ثيوجليكولات thioglycollate أو سيستايين cystiene وبذلك يتم النمو تحت السطح.

٢- بإزالة الهواء بواسطة مضخة تفريغ vacuum pump وطرد الأوكسيجين المتبقي بواسطة غاز النيتروجين، وعادة يتم تزويد الوسط بالنيتروجين وثاني أوكسيد الكربون CO_2 معاً بسبب احتياج النمو كمية قليلة من CO_2.

٣- استخدام الإناء المعبأ بالغاز Gas-Pak Jar. وهو الأفضل لتنمية أعداد صغيرة لاهوائياً. ويتم عمل بيئة هذه الأواني اللاهوائية باستخدام الهيدروجين والباللييديام pallidium كعامل مساعد لإزالة O_2 عن طريق تكوين ماء (انظر الشكل رقم ٧٥).



الشكل رقم (٧٥). نوعان من طرق زراعة البكتيريا في ظروف لاهوائية: أ) وعاء الشمعة، والذي تنمو فيه البكتيريا المحبة للقلة هوائية حيث يختزل الأوكسيجين بواسطة احتراق الشمعة. ب) وعاء لاهوائي، وفيه يتم تحرير الهيدروجين من مولد الذي يخلط بعدئذ بالأوكسيجين ليكون ماء ويخلق بيئة لاهوائية (عن: Alcamo, 2001).

٤- باستخدام أكياس أو جيوب بلاستيكية plastic bags or pouches لتحضين عينات قليلة وحيث يستخدم عامل مساعد مع كربونات كالسيوم لإنتاج وسط لاهوائي غني في CO_2.

٣- نشاط الماء Water Activity

على الرغم من أن كل الكائنات تحتاج إلى الماء اللازم للعمليات الحيوية والنمو والتكاثر، إلا أن الماء ضروري جداً لكثير من العمليات الكيموحيوية، ومن ثم فإن إتاحته للكائن تؤثر بشدة على معدلات نموه. ونعني بنشاط الماء مدى إتاحته للاستخدام بواسطة الأحياء الدقيقة. ويعبر عن الماء الموجود في الجو بما يسمى الرطوبة النسبية relative humidity (RH). وتساوي الرطوبة النسبية = ١٠٠ × aw نشاط الماء. وللماء النقي نشاط ماء = ١.٠.

ويؤثر الامتصاص adsorption والذائبات solutes على مدى إتاحة الماء، ومن ثم تقلل من نشاط الماء. فإضافة تركيزات عالية من السكر، مثلاً، تقلل من نشاط وإتاحة الماء وكذلك أيضاً يفعل ملح الطعام (كلوريد الصوديوم) وغيره من الذائبات. وللمحلول المشبع من كلوريد الصوديوم نشاط ماء = ٠,٨ ، لذلك نجد أن الكثير من الأحياء الدقيقة تحتاج إلى نشاط ماء أكثر من ٠,٩ . وعلى خلاف ذلك فإن بعض الأحياء الدقيقة تستطيع أن تنمو عند نشاط ماء منخفض، وبذلك تسمى متحملة الجفاف Xerotolerant، مثل بعض الخمائر التي تستطيع النمو عند نشاط ماء =٠,٦ وكقاعدة عامة فإن الفطريات تستطيع أن تتحمل نشاط ماء منخفض أكثر من غيرها.

وكما سبق القول فإن كمية الماء المتاحة للأحياء الدقيقة يمكن أن تختزل بواسطة التفاعل بين جزيئات الذائبات solutes (تأثير العامل الأسموزي) أو بواسطة الامتصاص إلى سطوح المواد الصلبة. وبسبب أن للتركيز الأسموزي للبيئة تأثيرات شديدة على الأحياء الدقيقة، فإنه من المفيد التعبير عن درجة الماء المتاح كمياً. ويستخدم علماء الحياة عادة نشاط الماء water activity (aW) لهذا الغرض. . وهو مكافىء أيضاً لنسبة ضغط بخار المحلول vapor pressure (Psoln) إلى ضغط الماء النقي (P water) أي

$$aw = \frac{P\ soln}{P\ water}$$

ونشاط الماء النقي = ١ وفيه تعيش كولياكتر *Caulibacter* وسبايريللام *Spirillum*، وفي دم الإنسان = ٠,٩٩٥ وفيه تعيش ستربتوكوكاس *Streptococcus* وإشيريشيا، وفي ماء البحر = ٠,٩٨٠ وفيه تعيش سيدوموناس *Pseudomonas* وفيبريو *Vibrio*، وفي البحيرات والسمك المملح = ٠,٧٥٠ وفيه تعيش هالوباكتر *Halobacter* وهالوكوكاس *Halococcus* وفي الحبوب والحلوى والفواكه المجففه = ٠,٧٠٠ وفيه تعيش بعض الفطريات.

٤ – الذائبات Solutes

بسبب أن الغشاء البلازمي المنفذ انتخابياً يفصل الأحياء الدقيقة عن بيئتها، فإنها يمكن أن تتأثر بواسطة التغيرات في التركيز الأسموزي للبيئة المحيطة بها. فإذا وضع كائن دقيق في محلول ناقص الأسموزية hypotonic solution (أي المحلول منخفض التركيز الأسموزي)، فإن الماء سوف يدخل إلى داخل الخلية ويسبب انفجارها ما لم يتم عمل شيء لمنع تدفق الماء. ولمعظم البكتيريا والفطريات والطحالب جدر خلوية صلبة والتي تحافظ على شكل وتكامل الخلية. وفي الواقع، فإن معظم الأحياء الدقيقة تحافظ على التركيز الأسموزي لبروتوبلازمها فوق ذلك الخاص بالبيئة عن طريق استخدام الذائبات المتنافسة compatible solutes، ومن ثم فإن الغشاء البلازمي يكون دائماً ضاغطاً بشدة على الجدار الخلوي. والذائبات المتنافسة compatible solutes هي تلك التي تتنافس على الأيض والنمو عندما تكون في تركيزات عالية داخل الخلايا. وتزيد معظم البكتيريا تركيزها الأسموزي الداخلي من خلال تخليق أو

أخذ كولين choline وبيتين betaine وبرولين proline وحامض جلوتاميك glutamic acid والأحماض الأمينية الأخرى، كما تشارك أيضاً في ذلك مستويات أيونات البوتاسيوم المرتفعة. وتستخدم الطحالب والفطريات السكروز والسكريات الكحولية polyols مثل أرابيتول arabitol وجليسرول glycerol ومانيتول mannitol لنفس الغرض. وتعد هذه السكريات الكحولية والأحماض الأمينية ذائبات مثالية لهذا الغرض لأنها عادة لا تحدث اضطراباً في تركيب أو وظيفة الإنزيمات. وترفع قليل من البكتيريا، مثل هالوباكتيريام ساليناريام *Halobacterium salinarium* تركيزها الأسموزي بواسطة أيونات البوتاسيوم (ويرتفع أيضاً أيون الصوديوم ولكن ليس بنفس درجة البوتاسيوم). وحيث إن الأوليات لا تمتلك جدراً خلوية فإنها لا بد أن تستعمل فجواتها المنقبضة لاستبعاد الماء الزائد عندما تعيش في بيئات منخفضة الأسموزية.

وتختلف الأحياء الدقيقة بشدة في قدرتها على التكيف للبيئات التي نشاطها المائي منخفض. ويجب أن ينفق الكائن الدقيق جهداً إضافياً لينمو في بيئة ذات نشاط ماء منخفض لأنها يجب أن تحافظ على تركيز عال من الأملاح الداخلية حتى تحافظ على مائها. ويمكن أن تعمل بعض الأحياء الدقيقة ذلك والتي تسمى متحملة الأسموزية osmotolerant حيث تستطيع أن تنمو على مدى واسع من نشاط الماء أو التركيز الأسموزي. فمثلاً، يمكن لستافيلوكوكاس أورياس *Staphylococcus aureus* أن تزرع في أوساط تحتوي على تركيز كلوريد الصوديوم حتى نحو ٣ عياريات، وهذا يفسر لماذا تنمو ستافيلوكوكاس على سطح الجلد حيث يتوفر تركيز عال من الملح نتيجة العرق. أما الخميرة من نوع ساكارومايسيز روكسياي *Saccharomyces rouxii* فسوف تنمو في محاليل سكرية قيم نشاط الماء فيها منخفضة حتى ٠,٦، ويتحمل طحلب دونالييلا فيريديز *Dunaliella viridis* تركيزات كلوريد الصوديوم من ١,٧ من العياريات حتى التشبع.

وعلى الرغم من أن عدداً قليلاً من الأحياء الدقيقة تعد متحملة أسموزياً حقيقية، إلا أن أغلبها ينمو جيداً فقط عند نشاط ماء حول ٠,٩٨ (وهو نشاط الماء التقريبي لماء البحر) أو أعلى. وهذا يفسر لماذا يكون الطعام الجاف أو المضاف إليه كميات كبيرة من الملح والسكر يكون فعالاً في منع فساد الطعام. ولأن العديد من الفطريات تكون متحملة للأسموزية، لذلك فإنها تكون مهمة بشكل خاص في فساد الأطعمة الجافة والمملحة.

وتعد الكائنات المحبة للملوحة Halophiles قد تكيفت تماماً للظروف الملحية بحيث أنها تحتاج لمستويات عالية من كلوريد الصوديوم كي تنمو، أي في تركيزات ما بين ٢,٨ من العياريات ودرجة التشبع (٦,٢ من العياريات) فيما يتعلق بالبكتيريا متطرفة الملوحة extreme halophilic bacteria. ويمكن عزل البكتيريا القديمة (أركيوبكتيريا) archeobacteria مثل هالوباكتيريام *Halobacterium* من البحر الميت (بحيرة بين فلسطين المحتلة والأردن وهي أكثر البحيرات إنخفاضاً في العالم)، ومن البحيرة الملحية العظمى بولاية يوتا الأمريكية، ومن البيئات التي يصل فيها

تركيزات الملح إلى التشبع. وقد حورت بشدة هالوباكتيريام وغيرها من البكتيريا متطرفة الملوحة تركيب بروتيناتها وأغشيتها من دون أن تزيد تركيزات الذائبات الداخل خلوية مثلما تفعل معظم الأحياء الدقيقة المتحملة للأسموزية. وهذه الكائنات متطرفة الملوحة تعمل تراكماً لكميات ضخمة من البوتاسيوم من أجل أن تبقى زائدة الأسموزية hypertonic بالنسبة لبيئاتها. إذ قد يصل تركيز البوتاسيوم الداخلي إلى ٤ أو ٧ عياريات وتحتاج إنزيمات وريبوزومات وبروتينات النقل لهذه البكتيريا إلى مستويات عالية من البوتاسيوم من أجل الاستقرار والنشاط. ولا تمتلك هذه البكتيريا أية مرونة بيئية. وتوجد كائنات محبة للملوحة المتطرفة extreme halophiles حيث تصل إلى أقصى نموها عندما يكون تركيز المحاليل من ملح الطعام مشبعاً saturated brine. وتنمو جيداً عند تركيز ملح أعلى من ١٥٪ مثلما يحدث في البحيرات وبراميل المخللات والأسماك المملحة كالفسيخ والسردين.

٥– الأس الهيدروجيني pH

يعرف الأس أو الرقم الهيدروجيني للمحلول بأنه تركيز أيون الهيدروجين (H) في هذا المحلول. ويساوي الرقم الهيدروجيني – لوغاريتم تركيز الهيدروجين ($-\log (H^+)$) ويكون المحلول المتعادل رقمه الهيدروجيني مساوياً ٧، أما المحلول الحامضي فيكون أقل من ٧ على حين يكون المحلول القلوي أكثر من ٧ وحتى رقم ١٤.

وتختلف الأحياء الدقيقة في مدى تحملها للأس الهيدروجيني. إذ تتميز الفطريات بصفة عامة بأنها ذات مدى أوسع (٥–٩) من البكتيريا (٦–٩). هذا علاوة على أن بعض الفطريات يمكنها أن تنمو عند أس هيدروجيني ١ وبعض الطحالب الدقيقة تنمو عند أس هيدروجيني ٢. وعلى الرغم من أن معظم البكتيريا لا تستطيع أن تنمو عند أس هيدروجيني منخفض إلا أن هناك استثناءات، فبعض أفراد جنس ثيوباسيللاس *Thiobacillus* تكون محبة للحموضة acidophiles وتنمو فقط عند أس هيدروجيني نحو ٢. وبذلك تكون الكائنات الدقيقة محبة التعادل neutrophiles درجة نموها المثلى ما بين ٥,٥–٨، أما المحبة للقلوية alkalophiles فهي تفضل أس هيدروجيني ما بين ٨,٥ – ١١,٥، وذلك مقارنة بالمحبة للحموضة التي تنمو ما بين صفر إلى ٥,٥. وعموماً فإن للمجموعات البكتيرية المختلفة صفات تفضيلية للأس الهيدروجيني. فمعظم الفطريات تفضل البيئة الحامضية قليلاً ما بين أس هيدروجيني ٤–٦. أما معظم البكتيريا والأوليات فهي متعادلة، إلا أن الطحالب تفضل البيئة الحامضية قليلاً، ومع هذا فتوجد العديد من الاستثناءات لهذه العموميات فمثلاً طحلب سيانيديام كالديريام *Cyanidium caldarium* وبكتيرة سلفولوباس أسيدوكالديرياس *Sulfolobus acidocaldarius* يوجدان في الينابيع الحارة الحامضية وينمو كلاهما جيداً ما بين أس هيدروجيني ١–٣ وعند درجات حرارة عالية.

وعلى الرغم من أن الأحياء الدقيقة تنمو جيداً على مدى واسع من الأس الهيدروجيني، إلا أنه توجد حدود لتحملها. كما أن التغيرات الشديدة في الأس الهيدروجيني يمكن أن تضر الأحياء الدقيقة عن طريق إحداث

اضطراب في الأغشية البلازمية أو تثبيطها لنشاط الإنزيمات وبروتينات النقل الموجودة بالأغشية. ويحدث موت للخلايا البكتيرية إذا انخفض الأس الهيدروجيني المتعادل إلى ٥ أو ٥.٥. كما أن تغيرات الأس الهيدروجيني الخارجي قد تغير من تأمين جزيئات المغذيات ومن ثم تختزل إتاحتها للكائن.

وعلى الرغم من مدى الثبايتات الواسعة في بيئة الأس الهيدروجيني، إلا أن الأس الهيدروجيني الداخلي لأغلب الأحياء الدقيقة يكون قريباً من التعادلية. وتغير معظم الأحياء الدقيقة الأس الهيدروجيني لبيئتها إما إلى الحامضية وإما إلى القلوية عن طريق إنتاجها للفضلات الأيضية. وتكوّن الأحياء الدقيقة المخمِّرة أحماضاً عضوية من الكربوهيدرات، على حين أن كيميائية التغذية الغير عضوية chemolithotrophs مثل ثيوباسيللاس *Thiobcillus* تؤكسد مكونات الكبريت المختزلة إلى حامض كبريتيك. أما بعض الأحياء الدقيقة الأخرى فإنها تجعل بيئتها أكثر قلوية عن طريق توليد الأمونيا من تكسير الأحماض الأمينية. وتضاف المحاليل المنظِّمة buffers غالباً إلى الأوساط الغذائية لمنع تثبيط النمو الذي ينتج عن التغيير في الأس الهيدروجيني وإبقاء الأس الهيدروجيني على طبيعته.

٦- الضغط Pressure

تتعرض معظم الأحياء الدقيقة التي تمضي حياتها على الأرض أو سطح الماء إلى ضغط مقداره ١ ضغط جوي واحد، ولا تتأثر مطلقاً بهذا الضغط. أما في المحيطات (١٠٠٠ متر في العمق أو أكثر) والبحار (٧٥٠ متر عمقاً)، فإن الضغط الهيدروستاتيكي hydrostatic يمكن أن يصل ٦٠٠ – ١١٠٠ ضغط جوي في عمق البحر، على حين تكون درجة الحرارة ٢-٣°م. وعلى الرغم من هذه الظروف المتطرفة ، فإن البكتيريا يمكن أن تتكيف معها وتعيش ويطلق على هذه الكائنات التي تتحمل ضغط الماء العالي متحملة الضغط barotolerant. وأن أي زيادة في ضغط الماء يمكن أن يؤثر سلباً على نمو هذه الكائنات ولكن ليس بمثل التأثير القاسي الذي يحدث للكائنات غير المتحملة. وتنمو جيداً بعض البكتيريا الموجودة كما في اللافقاريات التي تعيش في عمق البحر. ولذلك يطلق عليها كائنات محبة للضغط barophiles والتي تنمو أكثر سرعة عند الضغوط المائية العالية. وقد تلعب بكتيريا الأمعاء هذه دوراً مهماً في إعادة تدوير المواد المغذية في عمق البحر. وقد تم عزل نوع من البكتيريا المحبة للضغط من إخدود ماريانا بالقرب من الفلبين على عمق ١٠٥٠٠متر والتي لا تستطيع أن تنمو عند ضغط أقل من ٤٠٠- ٥٠٠ ضغط جوي عند درجة حرارة ٢°م.

٧- الإشعاع Radiation

تنبعث في الجو أنواعٌ عديدة من الإشعاعات الكهرومغناطيسية. وكلما قصرت الأطوال الموجية لهذه الإشعاعات كلما زادت طاقتها مثل أشعة جاما gamma والأشعة فوق البنفسجية ultraviolet التي تتفوق على طاقة أشعة الضوء المرئي أو تحت الحمراء infrared.

وتعد الشمس المصدر الأعظم للإشعاع على الأرض والتي تشمل الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية وتحت الحمراء وموجات الراديو. ويتميز الضوء المرئي بأنه الأكثر وضوحاً وأهميته عن غيره حيث تعتمد كل صور الحياة على قدرة الكائنات الحية المخلّقة ضوئياً photosynthetic على اصطياد الطاقة الضوئية من الشمس. ويقع تقريباً ٦٠٪ من الإشعاع في منطقة الأشعة تحت الحمراء والتي تعد المصدر الأعظم لحرارة الأرض.

وعند مستوى البحر يوجد قليل جداً من الأشعة فوق البنفسجية من موجات أقصر من ٢٩٠–٣٠٠ نانومتر. وتمتص الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي الأقل من ٢٨٧ نانومتراً بواسطة الأوكسيجين O_2 الموجود بالغلاف الجوي، وبهذا تتكون طبقة الأوزون ozone (O_3) بين ٢٥–٣٠ ميلاً فوق سطح الأرض. عندئذ تمتص طبقة الأوزون الأشعة فوق البنفسجية الأطول لتكون O_2. وتعد إزالة هذه الإشعاعات فوق البنفسجية حرجة بسبب أنها تسبب تدمير للنظم الأحيائية. وتعد معظم صور الإشعاعات الكهرومغناطيسية ضارة جداً للأحياء الدقيقة. وينطبق ذلك تماماً على الأشعة المؤيّنة ionizing radiations، أي الإشعاعات قصيرة الطول الموجي أو عالية الطاقة والتي يمكن أن تسبب تكوين ذرات تفقد إلكترونات أي تتأين: ويوجد نوعان من الإشعاعات ١– الأشعة السينية (إكس) X-rays والتي تنتج صناعياً، ٢– أشعة جاما Gamma rays والتي تنبعث emitted أثناء تحلل decay النظائر المشعة isotopes.

وسوف ينتج عن المستويات المنخفضة من أشعة جاما أو السينية طفرات mutations والتي قد تسبب الموت بطريقة غير مباشرة، على حين أن الجرعات الأعلى تسبب موتاً مباشراً للأحياء الدقيقة.

وعلى الرغم من أن الأحياء الدقيقة أكثر مقاومة للأشعة المؤيّنة عن الكائنات الأرقى إلا أنها تدمّر بالجرعات العالية. ويمكن أن تستخدم الأشعة المؤيّنة لتعقيم sterilize الأشياء، إلا أن بعض البكتيريا مثل دينوكوكاس راديوديورانز *Deinococcus radiodurans* والجراثيم البكتيرية الداخلية bacterial endospores يمكنها أن تتحمل جرعات عالية من الإشعاع المؤين.

وتشمل التغيرات التي تحدث الإشعاعات المؤيّنة في الخلايا الميكروبية ١– كسر الروابط الهيدروجينية، ٢– أكسدة الروابط المتأينة، ٣– تدمير التراكيب الخلقية، ٤– تبلمر بعض الجزيئات. ومن المحتمل أن يشجع الأوكسيجين التأثيرات التدميرية، ربما من خلال توليد شقوق الهيدروكسيل (OH). وعلى الرغم من أن أنواعاً عديدة من المكونات الخلوية تتأثر إلا أن أهمها هو تدمير د.ن.أ (ح.ن.أ DNA) الذي يعد المسبب الرئيسد لموت الخلاياد.

أما الأشعة فوق البنفسجية فإنها تقتل كل الأحياء الدقيقة بسبب قصر طولها الموجي (الذي يتراوح ما بين ١٠–٤٠٠ نانومتر) وطاقتها العالية. وأن الطول الموجي الأكثر قتلاً هو ٢٦٠ نانومتراً لأنه يدمر د.ن.أ (DNA). ويعود

التأثير الابتدائي لتدمير الأشعة فوق البنفسجية إلى تكوين ثنائيات ثايمين thymine dimmers في د.ن.أ . حيث تصبح ثنائيات ثايمين المتجاورة في خيط د.ن.أ مرتبطة معاً تساهمياً covalently ومن ثم تسبب تثبيط تكاثر د.ن.أ ووظائفه.

ويمكن إصلاح هذا العطب بعدة طرق. ويعد إعادة التنشيط الضوئي photoreactivation أهم هذه الطرق، حيث يسبب الضوء الأزرق تأثيراً على إنزيم إعادة التنشيط الذي يشطر ثنائي الثايمين. وإذا كان التعرض للأشعة فوق البنفسجية شديداً جداً فإن العطب يكون شاملاً بحيث لا يمكن إصلاحه.

obeikandi.com